

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-281252

(43)Date of publication of application : 10.10.2001

(51)Int.Cl.

G01N 33/566
G01N 33/53
G01N 35/10
// G01N 1/10
G01N 35/02

(21)Application number : 2000-100395 (71)Applicant : INST OF PHYSICAL & CHEMICAL RES
ST RESEARCH KK

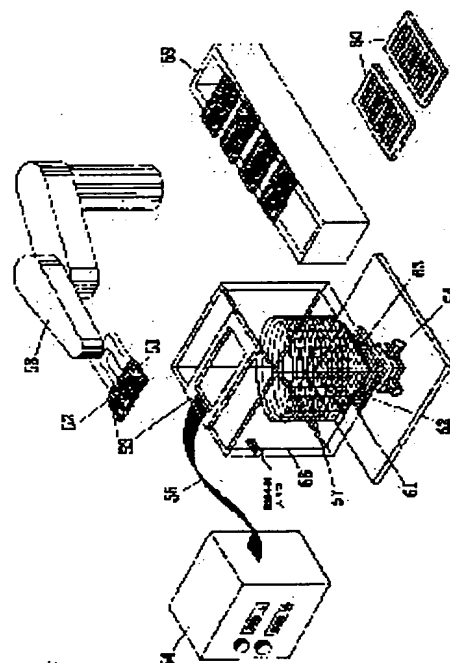
(22)Date of filing : 03.04.2000 (72)Inventor : YAMAGATA YUTAKA
INOUE KOZO

(54) MICRO ARRAY-CREATING DEVICE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a device for creating a high-density micro array consisting of spots ranging from several tens of μm to several μm with the samples of cDNA and protein that are prepared separately as a target.

SOLUTION: The micro array-creating device is provided with an electro spray means for successively and electrostatically atomizing a plurality of solutions containing each of a plurality of biologically active types of samples, a support means for supporting a plurality of sample chips 62 where a sample in the solution being atomized from the electro spray means is deposited, a mask means that is arranged between the electro spray means and the support means, and has the same number of sample chips for selectively and simultaneously deposits the sample at a specific position corresponding to the plurality of sample chips, and a traveling means for simultaneously creating the plurality of micro arrays by relatively moving the sample chip-supporting means and the mask means, and at the same time depositing a plurality of samples on each of the plurality of sample chips. This device can mass-produce high-density micro arrays inexpensively.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-281252

(P2001-281252A)

(43) 公開日 平成13年10月10日 (2001. 10. 10)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/566

G 0 1 N 33/566

2 G 0 5 8

33/53

33/53

M

35/10

1/10

N

// G 0 1 N 1/10

35/02

F

35/02

35/06

H

審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号

特願2000-100395(P2000-100395)

(22) 出願日

平成12年4月3日(2000. 4. 3)

(71) 出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢2番1号

(71) 出願人 399014875

エス・ティ・リサーチ株式会社

東京都渋谷区広尾1-11-5-1403

(72) 発明者 山形 豊

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

(74) 代理人 100059258

弁理士 杉村 暁秀 (外2名)

最終頁に続く

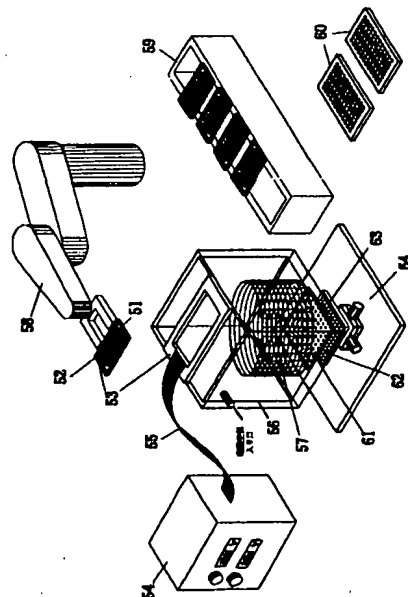
(54) 【発明の名称】 マイクロアレイ作製装置

(57) 【要約】

(修正有)

【課題】 別途に調製された cDNA や蛋白質の試料を対象として、数十 μm から数 μm の大きさのスポットから成る高密度マイクロアレイの作製装置の提供。

【解決手段】 マイクロアレイ作製装置は、生物学的に活性な複数種類の試料の各々を含む複数の溶液を順次静電噴霧するエレクトロスプレー手段と、これから噴霧される溶液中の試料が堆積される複数のサンプルチップ62を支持する支持手段と、エレクトロスプレー手段と支持手段との間に配置され、複数のサンプルチップの対応する所定の位置に、試料を選択的に同時に堆積させるようにサンプルチップの個数と同数の孔を有するマスク手段と、サンプルチップ支持手段とマスク手段とを相対的に移動させながら複数のサンプルチップのそれぞれの上に複数の試料を堆積させて複数のマイクロアレイを同時に作製する移動手段と、を具える。本装置によれば、高密度のマイクロアレイを安価に大量作製できる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 生物学的に活性な複数種類の試料の各々を含む複数の溶液を順次静電噴霧するエレクトロスプレー手段と、

このエレクトロスプレー手段から噴霧される溶液中の試料が堆積される複数のサンプルチップを支持する支持手段と、

前記エレクトロスプレー手段と前記支持手段との間に配置され、前記複数のサンプルチップの対応する所定の位置に、前記試料を選択的に同時に堆積させるように前記サンプルチップの個数と同数の孔を有するマスク手段と、

前記サンプルチップ支持手段とマスク手段とを相対的に移動させながら前記複数のサンプルチップのそれぞれの上に前記複数の試料を堆積させて複数のマイクロアレイを同時に作製する移動手段と、を具えるマイクロアレイ作製装置。

【請求項2】 前記エレクトロスプレー手段が、電極を有する単一のキャピラリと、このキャピラリに前記複数種類の試料をそれぞれ含む複数の溶液を順次に供給する液体供給手段とを具えることを特徴とする請求項1に記載のマイクロアレイ作製装置。

【請求項3】 前記キャピラリを或る溶液の噴霧後、次の溶液の供給前に洗浄する洗浄手段を設けたことを特徴とする請求項2に記載のマイクロアレイ作製装置。

【請求項4】 前記エレクトロスプレー手段が、それぞれが前記複数の試料を含む複数の溶液を収容し、それぞれが選択的に静電噴霧用電源に接続される電極を有する複数のキャピラリを保持する複数のマルチキャピラリカセットを保持する手段と、これら複数のマルチキャピラリカセットを順次に切換えてエレクトロスプレー位置へ搬送する手段とを具えることを特徴とする請求項1に記載のマイクロアレイ作製装置。

【請求項5】 前記エレクトロスプレー手段に、静電噴霧を行うにあたり、前記キャピラリに加圧空気を供給してキャピラリの先端に溶液を搬送する加圧手段を設けたことを特徴とする請求項1～3の何れかに記載のマイクロアレイ作製装置。

【請求項6】 前記エレクトロスプレー手段に、静電噴霧を行うにあたり、前記マルチキャピラリカセットの全てのキャピラリに同時に加圧空気を供給してこれらキャピラリの先端に溶液を搬送する加圧手段を設けたことを特徴とする請求項4に記載のマイクロアレイ作製装置。

【請求項7】 前記複数のマルチキャピラリカセットを保持する手段に、これら保持されているマルチキャピラリカセットに収容されている複数の溶液を温度制御する手段を設けたことを特徴とする請求項4に記載のマイクロアレイ作製装置。

【請求項8】 前記エレクトロスプレー手段に、前記キャピラリから静電噴霧される物質が拡散するのを防止する

ガードリングおよびシールドを設けたことを特徴とする請求項1～7の何れかに記載のマイクロアレイ作製装置。

【請求項9】 前記マスク手段の孔の、前記エレクトロスプレー手段に対向する側のサイズを、前記支持手段に対向する側のサイズよりも大きくしたことを特徴とする請求項1～8の何れかに記載のマイクロアレイ作製装置。

【請求項10】 前記マスク手段が、前記孔内の粒子を静電的に収束するコリメーティングリングを一体的に具えることを特徴とする請求項9に記載のマイクロアレイ作製装置。

【請求項11】 前記マスク手段のコリメーティングを、一対の絶縁体層の間に挟んだことを特徴とする請求項10に記載のマイクロアレイ作製装置。

【請求項12】 前記サンプルチップ支持手段とマスク手段とを相対的に移動させる移動手段が、前記サンプルチップ支持手段をマスク手段に対して移動させるXYステージまたはXYZステージを具えることを特徴とする請求項1～11の何れかに記載のマイクロアレイ作製装置。

【請求項13】 前記マスク手段に形成された複数の孔の各々の近傍において、マスク手段の前記サンプルチップと対向する面に固着され、既に堆積された試料スポットと干渉しない形状および寸法を有する複数のスペーサを具えることを特徴とする請求項1～12の何れかに記載のマイクロアレイ作製装置。

【請求項14】 前記キャピラリと、前記サンプルチップ支持手段及びマスク手段とを相対的に移動させながら前記複数のサンプルチップのそれぞれの上に前記複数の試料を堆積させて複数のマイクロアレイを同時に作製する移動手段を具えることを特徴とする請求項1～13の何れかに記載のマイクロアレイ作製装置。

【請求項15】 少なくともエレクトロスプレーが行なわれる空間をケースで囲み、このケースを経て清浄な乾燥空気を流す手段を具えることを特徴とする請求項1～14の何れかに記載のマイクロアレイ作製装置。

【請求項16】 前記サンプルチップが、導電性の物質をコーティングした非導電性の物質、または導電性の物質から作られており、アースされていることを特徴とする請求項1～15の何れかに記載のマイクロアレイ作製装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、近年急速に発展しつつあるマイクロアレイ（DNAチップ、蛋白質チップ、有機化合物チップ）等を作製するマイクロアレイ作製装置（マイクロアレイヤー）に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 近年、種々の細菌や酵母等のゲノム、即

ち全遺伝子の塩基配列が決定され、ヒトのゲノム塩基配列も近い将来に全て決定されようとしている。この様なゲノム科学の急速な進展は、決定された各遺伝子及びそれぞれの遺伝子によって生産される蛋白質の機能解明を可能にするものである。遺伝子の数は、酵母で約6200、ヒトでは約10万と言われており、各遺伝子・蛋白質の機能解明には膨大な数の遺伝子・蛋白質等を一度に扱える技術が必要とされている。その目的を満たす技術として注目され近年急激に発展しつつあるのが「マイクロアレイ」技術である。この技術の目的は、スライドガラス等の基板上に多数のオリゴヌクレオチドを合成したり、cDNAや蛋白質を固定化させたりすることにより高密度の実験系を実現しようとするものである。例えば、1つのスライドガラス上に全遺伝子(ゲノム)のcDNAスポットを作製し、ハイブリダイゼーションさせ、ハイブリッド形成の強度を指標にして各遺伝子の発現量を測定する実験系を構築するものである。

【0003】例えば、米国特許5445934号には、その基板上で合成されたオリゴヌクレオチドを1cm²に1000個以上含有するDNAチップが開示されている。一方、ネイチャー・ジェネティック・サプリメントVol.21 (1999年1月、p33~37;Patrick O.Brown他、p25~32;David D.L.Bowtell)等には、cDNA溶液をピンを用いてスライドガラス上にスポットする方法が開示されている。また、米国特許5807522には、ソレノイドにより振動を与えて、cDNA溶液をスライドガラス上にスポットする方法が開示されている。

【0004】従来のマイクロアレイ作製方法として

- (1) 光リソグラフィ法
- (2) マイクロスポッティング法
- (3) インクジェット法

が知られている。(1)は、半導体製造法と同様の技術(光リソグラフィ)によって基板上でオリゴヌクレオチドを合成する方法である。(2)は、ピン等を用いて機械的に基板上にcDNA等をスポットさせる方法である。

(3)は、圧電素子等を用いて小さいノズルからcDNA等を滴下させる方法である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】(1)の方法によれば、約50~250μm間隔に1つのスポットを作ることができ、高密度のマイクロアレイを作製することができる。しかし、この方法では、その基板上でオリゴヌクレオチドを合成するため、別途に調製されたcDNA等には適用できない。更に、フォトリソグラフィは、設計、作製に時間がかかり高価である。(2)(3)の方法では、別途に調製されたcDNA等を適用することができるが、スポットが300~1500μm位と大きすぎるため、高密度のマイクロアレイを作ることが困難である。また、機械的操作によるため、少量のチップを作るのには適しているが、大量のチップを作るのには適さない。スポッ

トの大きさが200μmから50μmになると必要な試料の量は約100分の1で済むという計算もある(文献ネイチャー・ジェネティック・サプリメントVol.21 (1999年1月、p15~19;Vivian G.Cheung他)。従って、マイクロアレイの実用化にあたっては、スポットをどれ位小さくして高密度のアレイを形成できるかは、解決すべき極めて重要な問題の1つである。

【0006】大量の遺伝子・蛋白質の機能解明が行われ、これらの知見を新薬の開発・疾患の診断・個々の患者への最適な薬剤の選択等の実際の用途に生かしていくためには、cDNAや蛋白質からなるマイクロアレイをより小さく高密度に、そして安価に作製する方法が必要である。従って、本発明の目的は、別途に調製されたcDNAや蛋白質の試料を対象として、数十μmから数μmの大きさのスポットから成る高密度マイクロアレイを作製する装置を提供することである。

【0007】PCT国際公開WO98/58745や文献アナリティカル・ケミストリ Vol.71 (1999年、p1415~1420及びp3110~3117;モロゾフ他)には、エレクトロスプレー(静電噴霧)により核酸や蛋白質等の生体高分子の生物活性を保持したまま基板上にフィルム状やスポット状に固化する方法・装置が開示されている。また、種々の条件を変える事により極めて小さいスポットを同時に多数作る方法・装置も開示されている。しかし、これらの方法・装置では、既にメッシュ状構造を持つフィルタ等を用いるのみで、多くの試料を目的の位置に配置させるマイクロアレイを作製することはできない。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、これらの知見を発展させ、任意のパターンを持つcDNAや蛋白質の高密度マイクロアレイを作製する装置を提供するものである。本発明によるマイクロアレイ作製装置は、生物学的に活性な複数種類の試料の各々を含む複数の溶液を順次静電噴霧するエレクトロスプレー手段と、このエレクトロスプレー手段から噴霧される溶液中の試料が堆積される複数のサンプルチップを支持する支持手段と、前記エレクトロスプレー手段と前記支持手段との間に配置され、前記複数のサンプルチップの対応する所定の位置に、前記試料を選択的に同時に堆積させるように前記サンプルチップの個数と同数の孔を有するマスク手段と、前記サンプルチップ支持手段とマスク手段とを相対的に移動させながら前記複数のサンプルチップのそれぞれの上に前記複数の試料を堆積させて複数のマイクロアレイを同時に作製する移動手段と、を具えることを特徴とするものである。更に、本発明によるマイクロアレイ作製装置は、エレクトロスプレーの際に、キャピラリをエレクトロスプレー中心部へ移動させ高圧電源と接触させた後、PCT国際公開WO98/58745や文献アナリティカル・ケミストリ Vol.71 (1999年、p1415~1420及びp3110~3117;モロゾフ他)に開示された方法によって行うこ

とを特徴とするものである。

【0009】また、本発明の第1の実施態様によるマイクロアレイ作製装置は、このエレクトロスプレイ手段が、電極を有する単一のキャピラリと、このキャピラリに前記複数種類の試料をそれぞれ含む複数の溶液を順次に供給する液体供給手段とを具えることを特徴とする。また、必要に応じて、キャピラリを或る溶液の噴霧後、次の溶液の供給前に洗浄する洗浄手段を設けても良い。更に、本発明の第2の実施態様によるマイクロアレイ作製装置は、前記エレクトロスプレイ手段が、それぞれが10 前記複数の試料を含む複数の溶液を収容し、それぞれが選択的に静電噴霧用電源に接続される電極を有する複数のキャピラリを保持する複数のマルチキャピラリカセットを保持する手段と、これら複数のマルチキャピラリカセットを順次に切換えてエレクトロスプレイ位置へ搬送する手段とを具えることを特徴とする。更に、本発明によるマイクロアレイ作製装置は、両実施態様共に、前記エレクトロスプレイ手段に、静電噴霧を行うにあたり、前記キャピラリに加圧空気を供給してキャピラリの先端に溶液を搬送する加圧手段を設けたことを特徴とする。更に、本発明によるマイクロアレイ作製装置は、両実施態様共に、静電噴霧を行うにあたり、キャピラリを移動する移動手段を設ける事も可能である。

【0010】また、エレクトロスプレイを補助するために、エレクトロスプレイ手段において、静電噴霧を行うにあたり、前記マルチキャピラリカセットの全てのキャピラリに同時に加圧空気を供給してこれらキャピラリの先端に溶液を搬送する加圧手段を設けさせることも可能である。また、複数のマルチキャピラリカセットを保持する手段に、これら保持されているマルチキャピラリカセットに収容されている複数の溶液を温度制御（例えば、冷却）する手段を設けさせることも可能である。これによって、試料の生物学的活性や生物学的機能などを保持することができる。

【0011】

【発明の実施の形態】実施態様1

本発明の第1の実施態様によるマイクロアレイ作製装置としてシングルキャピラリシステムについて説明する。図1に示すように、シングルキャピラリシステムは、キャピラリ11が1本である。本装置は、大きくは、エレクトロスプレイ部10、マスク部20、基板支持部30からなる。生物学的に活性な試料を含む溶液をエレクトロスプレイし、マスクを通過させることによって基板の堆積エリア上の所望の位置に堆積させるマイクロアレイ作製装置であって、この装置は、電極を有するキャピラリ11とガードリング12とシールド13を具えたエレクトロスプレイ部10と、マスク21及びマスクホルダ22を有するマスク部20と、サンプルチップ31とサンプルチップホルダ32を具えた移動可能な基板支持部30とを有する。本発明によるマイクロアレイ作製装置

は、生物学的に活性な複数種類の試料の各々を含む複数の溶液を順次静電噴霧するエレクトロスプレイ手段と、このエレクトロスプレイ手段から噴霧される溶液中の試料が堆積される複数のサンプルチップ31を支持する支持手段と、前記エレクトロスプレイ手段と前記支持手段との間に配置され、前記複数のサンプルチップの対応する所定の位置に、前記試料を選択的に同時に堆積させるように前記サンプルチップの個数と同数の孔を有するマスク手段と、前記サンプルチップ支持手段とマスク手段とを相対的に移動させながら前記複数のサンプルチップ31のそれぞれの上に前記複数の試料を堆積させて複数のマイクロアレイを同時に作製する移動手段と、を特徴とする装置である。

【0012】このキャピラリ11（ガラス、プラスチック製等）には、cDNA或いは蛋白質等の溶液を収めることができ、内部に電極を持ち溶液に電気を伝達できる構造であり、かつキャピラリ上部より必要に応じて加圧空気を注入できる。多種類のcDNA或いは蛋白質等をスプレイする場合は、別途装備されるキャピラリ交換装置（図1には示さず）或いは手動により異なるキャピラリ11を順次装着するか、または、コンタミネーションを防ぐため試料の変更毎にキャピラリ11を純水等で洗浄した後、エレクトロスプレイを行う。静電噴霧を行うにあたり、キャピラリを移動させる移動手段を設けることも可能である（図1には示さず）。キャピラリを移動させることによって、一回でより大きな面積、即ち、より大量のサンプルチップに対して、試料を堆積させることができるようになる。移動手段は、キャピラリ側を移動させても、サンプルホルダ及びマスク側を移動させても良く、即ちキャピラリとサンプルチップの相対位置を変えることができれば良い。ガードリング12は、スプレイされたパーティクル（粒子）が散乱するのを防ぐための電極であり電気伝導性の物質により構成される。ES（エレクトロスプレイ）装置全体は、ケース14で覆われ、このケース14によって外部の空気攪乱や湿度からスプレイ部分全体を保護する。シールド13は、絶縁体或いは誘電体（プラスチック、ガラス等）から構成され、スプレイされたパーティクルの広がりを均一にする役割を持つ。

【0013】ケース14には乾燥空気等の清浄かつ低湿度の気体を導入する乾燥空気入り口15を設け、乾燥空気を導入することによってスプレイされたパーティクルの乾燥を促進するとともに汚染を防止する。サンプルチップホルダ32は複数のサンプルチップ31（マイクロアレイ）を固定するホルダであり、サンプルチップ31を真空吸着、静電吸着等の方法により固定し、マスク21との相対位置が正しく保たれるようにする。サンプルチップ31とマスク21とを正確に平行に保つことにより、サンプルチップ31とマスク21との距離（ギャップ）を一定に保つ機能を持つ。XYステージ33は、サ

ンプルホルダ32をXY平面内で駆動させることによりサンプルチップ31とマスク21の相対位置を変化させ、所望の位置に試料スポットが形成されるように制御する。

【0014】実施態様2

本発明の第2の実施態様によるマイクロアレイ作製装置としてマルチキャピラリシステムについて説明する。図2に示すように、マルチキャピラリシステムは、前述したシングルキャピラリシステムよりも多種類のcDNAや蛋白質等を効率よく静電噴霧しクロスコンタミネーションの無い試料スポットを形成するために複数のキャピラリ51と一緒に装着し自動的に静電噴霧する対象物質を切り替えるのに適したシステムである。マルチキャピラリカセット52は、複数のキャピラリ51と一緒に固定させ、それぞれのキャピラリ内の電極に電気的接続を行うための配線及び多配線コネクタ53及び加圧のための気体供給経路を持っている。これにより、ESD電装ユニット54（高電圧発生・スイッチング）から供給される多配線高電圧ケーブル55の電圧を電気的に切り替えることにより静電噴霧される物質を選択することが可能であり、高速に多種類の物質を切り替えて静電噴霧しスポットを形成することが可能となる。

【0015】多配線コネクタ53は多配線高電圧ケーブル55と接続されており、マルチキャピラリカセット52の装着によって、高圧電源とキャピラリ内の電極との電気的接続を行うことができる。ESD（静電気放電）電装ユニットは、エレクトロスプレイに必要な高電圧を発生し多配線高電圧ケーブル55、多配線コネクタ53を通じての高電圧の切り替え（スイッチ）による静電噴霧物質の切り替えを制御する。高圧電源は、静電噴霧するサンプル溶液に供給される高電圧（2000～4000V）以外にもガードリング（図2には示さず）、コリメーティングリングに必要とされる高電圧（500～3000V程度）の供給も行う。

【0016】ケース56は、シングルキャピラリシステムと同様にエレクトロスプレイを外乱から保護する。大型シールド57は、絶縁体或いは誘電体のメッシュ状のもので構成されており、静電噴霧されたパーティクルの分布を均一にする効果を持つ。キャピラリ自動交換装置58は、ロボットアーム或いはXYZステージ等で構成され、エレクトロスプレイ部とマルチキャピラリカセット格納場所59との間を移動可能であり、マルチキャピラリカセットを交換する。また、キャピラリ51に対するサンプル溶液の供給は、格納場所59に装備された供給装置で行うか或いは別途用意されたサンプルパレット60から自動交換機により吸引する。

【0017】マルチキャピラリシステムにおいては、各キャピラリと、対象となるマスクや基板との相対位置が異なるが、キャピラリとマスクや基板との距離が十分にあればパーティクルは均一に分散し、各チップ上の堆積

エリアに均一に堆積させることができる。もちろん、各キャピラリをエレクトロスプレイ部の中心部分に移動させ、そこでエレクトロスプレイを各キャピラリ毎に順次行うような装置を構成させることも可能である。シングルキャピラリシステムと同様にマルチキャピラリシステムにおいても、静電噴霧を行うにあたり、キャピラリを移動する移動手段を設けることが可能である（図2には示さず）。

【0018】マスク構造体40は、静電噴霧によってキャピラリから放出されたパーティクル（粒子）を各スポットに集め、所望の大きさのスポットとして所望の位置へ堆積させる働きを持つ。マスク40はシングルキャピラリシステム及びマルチキャピラリシステムで共通に利用可能であり、マスク40は、キャピラリ側から順次に絶縁体層41、電気導電体層42、絶縁体層43、マスク層44（絶縁体マスク層）を積層させたものである。絶縁体層41は、エレクトロスプレイの初期に荷電された粒子が付着することにより帯電し、静電的な反発により、その後の粒子の付着を防ぎ、スプレイされた材料が微小孔内に集中するように働く。また、マスク構造体全体として、エレクトロスプレイ手段に対向する側の孔のサイズを、サンプルチップ側（基板支持部側）の孔のサイズよりも大きくすることによって、試料粒子を収束させる効果がある。電気導電体層42であるコリメーティングリングは、金属等の電気導電体で形成されており、中間的な電圧を加えることにより粒子と静電的に反発し、粒子を小孔の中央に集めるような磁界を発生させ、捕集効率を向上させる働きを持つ。絶縁体層43は、コリメーティングリングと後述するマスク層44を絶縁する働きも持つ。

【0019】マスク層44は、マイカ、石英ガラス等を材料とする絶縁体或いは誘電体からなる薄い層（10～数100 μm ）で形成され、目的とするスポットとほぼ同じ大きさの孔44a（孔径数 μm ～100 μm ）を持つ。このマスク層44も、絶縁体層41、絶縁体層43と同様に荷電粒子が付着して、静電的な反発によってパーティクルを孔の中に集める働きをするものと考えられる。スパーサ45は、マスク構造体とサンプルチップ（サンプルホルダ）が直接接触しないように間隔を保つためのものであり、厚さ数 μm から数十 μm 程度のプラスチック、金属或いはガラス等の絶縁体から構成される。一枚のマスクには、約十～数万個のマスク孔を設けることができ、これにより多数個のサンプルチップを同時に形成することができる。

【0020】即ち、通常は、マスクの孔の数と並べるサンプルチップの個数を同数にして、複数個のチップを一回の作業で作製する。サンプルチップとしては、光学ガラス等の表面に導電性の物質（ITO（Indium Tin Oxide）、金属薄膜等）をコーティングしたもの、または金属板、ソーダガラス（導電性ガラス）、及び導電性プラ

スチック等が用いられる。但し、一般的には絶縁体であると考えられるプラスチック類であっても通常は僅かな導電性を有するため、導電性のコーティング剤を塗布することなく基板として用いることは可能である。従って、基板に適さないものは、実際にはフッ素樹脂、石英ガラス等に限られる。また、これらの導電性の部分等は、サンプルホルダ等を介してアースされている。各チップ上に堆積した粒子の電荷を抜く必要があるからである。本装置例では、チップ側の位置を移動させて、チップの堆積エリアを調整しているが、マスク側の位置を移動させても良い。また、透明ガラスの上に光によって導伝性を示す物質をコーティングして、下部から光を照射することによって各チップの堆積エリアを移動させるような装置（この場合、マスク部は不要となる）とすることも可能である。チップのサイズ等は、様々なバリエーションが考えられ、例えば、チップサイズ：10mm×10mm、一度にスプレー可能なサンプルチップの個数：100個（10×10）～数千個（33×33程度）、スポットの数：1,000個～100,000個、スポットサイズ：直径10ミクロン～50ミクロン程度の円形、スポットのピッチ：20ミクロン～100ミクロンが考えられる。スポットのサイズを大きくすることは容易であるが、その分チップの大きさが大きくなるか、スポットの数が減少することとなる。サンプルとしては、一般的には、タンパク質として、酵素、精製レセプター、モノクロナール抗体、抗体フラグメント等が挙げられる。また、DNA或いはcDNAおよびそのフラグメント、各種有機高分子化合物、或いは、膜内レセプター、ウイルスなどの微小パーティクルもサンプルとして利用できる。

【0021】本実施例の場合、1枚のマスクに100個の孔が空いているものを使用する。従って、サンプルホルダには10×10=100個のチップ（マイクロアレイ）を並べる。キャピラリー収納器具として、96ウェルを使用し、各々のキャピラリーには異なる種類のサンプル溶液を収める。全部で10000個のスポットを作製するため10000種類のサンプル溶液とこれを収めた105個の96ウェルのマルチキャピラリーカセットを用意する。チップは、10mm×10mmのものを使用し、直径20μmのスポットを80μm間隔で形成させる。従って、1枚のチップには10000個のスポットを形成させる。1個のスポットを作製するのに約10秒かかり、このチップ1個に10000個のスポットを作製するには約28時間かかる。即ち、約28時間で1万個のスポットを持つチップを100個作製することができる。

【0022】また、このマスク構造体の全体の構造は、その構成から製作が容易な構成となっている。製作の工程は以下の通りである。

(1) 絶縁体（PMMA、フッ素樹脂等）、金属（ア

ルミニウム、銅等）及び絶縁体を順次積層する。

(2) 積層されたプレートに上方からエンドミル等の工具により円錐形の孔を開ける。この状態で、コーティングリング電極（金属）が上方に向けて露出した状態となる。

(3) マイカ、石英ガラス等のマスクに、アブレイシブジェット、エッチング或いは微細機械加工等に方法により微細孔を多数形成し、これを(2)で形成された積層プレートに張り合わせる。

(4) 更に下部にスペーサを張り合わせ、マスク構造体を完成させる。

【0023】図4に示すマルチキャピラリーカセット70は、キャピラリー保持ベース71（PMMA等のプラスチック等）に、ガラス或いはプラスチック等のキャピラリー72を複数取り付け付けた構造となっている。各キャピラリーには（多配線）電気コネクタ73より配線74が施され、キャピラリー内の電極と接続されている。各キャピラリーには、各々異なる種類のサンプル溶液が収められる。また、これとは別途に加圧空気の入り口75及びその流路75を持っており、静電噴霧時にはサンプル溶液の加圧、或いは吸引時にはサンプル溶液の減圧を可能としている。この加圧、減圧については、本実施例の装置構成では、各キャピラリーに対して同時に加圧、減圧を行う。即ち、キャピラリーの加圧によって、各キャピラリーの先端にサンプル溶液を搬送して、静電噴霧を行い易い状態にするためのものである。この加圧は必ずしも必要は無いが、エレクトロスプレーがし易い状態を作り出すために補助的に用いられる。このようにキャピラリー先端にサンプル溶液を搬送した状態で、キャピラリーの1つに電圧をかけると、静電的な力によって、このキャピラリー先端部からサンプル溶液が微小液滴状態で飛び出す。もちろん、この加圧を各キャピラリー毎に制御して、例えば、各キャピラリー1本づつ加圧をかけて、それと連動して同時にその加圧したキャピラリーに対して電圧をかけるという構成をとることも可能である。このマルチキャピラリーカセット70は、通常はディスポーザブルであり、通常は洗浄を要しないが、洗浄手段を設けて再使用することも可能である。サンプル溶液は、図2に示すようなサンプルパレットから同時に多種類のサンプルを吸引しても良いし、予めサンプル溶液が収められたキャピラリーを保持ベースに取り付けても良い。

【0024】図5に示すように、シングルキャピラリー80は、ガラス或いはプラスチック等からできている構成された細い（数μm～数十μm）先端を持つ単一のキャピラリー81（直径1～数mm程度）と電極としての導電性ワイヤ82（プラチナ等）とキャピラリー保持具83より構成され、このキャピラリー内には、サンプル溶液を収めることができる。キャピラリー保持具83は、通常導電性ワイヤ82と電気的に接続され、エレクトロスプレー用の高圧電源へ接続される。キャピラリー保持具83の上

部には、エレクトロスプレイを補助する加圧空気の導入やサンプルをキャピラリ先端から供給する場合の減圧を行うことができるように入り口84が設けられており、これによりサンプルを連続して供給することができる。多種類のサンプルを使用する場合は、各種類毎にキャピラリを交換するか、または純水を吸引、排出を行うこと等によって洗浄を行う。但し、スクリーニング実験等を目的とする等の場合は、多少のコンタミネーションは問題とならないため、キャピラリ交換、キャピラリ洗浄は必要でない。

【0025】図6は、マルチキャピラリシステムの電気接続図を示すものである。マルチキャピラリシステムにおいては、複数のキャピラリ90、高電圧スイッチ91（電装部に内臓）及び高圧電源V1、V2、V3、ガードリング92、マスク構造体93、サンプルチップ94を並べた基板支持部より構成される。サンプルチップ94の表面は、導電性の物質によってコーティングされているか、または導電性の物質でできており、0V（グランド電位）に接続されている。マスク構造体93は、サンプルチップ94のすぐ上方に位置し、ガードリング電極95は、コリメーティング電圧V3に接続されている。ガードリング92は、V2に接続されており、キャピラリ90のうち静電噴霧すべき部分に高電圧スイッチ91を介してエレクトロスプレイ電圧V1が供給される。3種類の電圧は、通常V1=2000~5000V、V2=2000~5000V、V3=500~3000V程度となっており、V1≧V2>V3の関係を持つ。順次電圧がスイッチされるに従い、下方のマスク構造体93がXY（或いはXYZ）ステージにより駆動され所望の位置に所望の大きさでサンプルのスポットが形成される。これを繰り返すことにより所望の個数、サイズのスポットを持つチップを同時に複数個作製することが可能となる。

【0026】図7は、シングルキャピラリシステムの電気・配管接続を示す図である。前述したマルチキャピラリシステムは複数のキャピラリを擁するのに対して、シングルキャピラリシステムは、1本のキャピラリ100に順次サンプル溶液を供給することによりマイクロアレイを形成させるものである。このシングルキャピラリ100の後方には、送液ポンプ101とサンプル溶液を順次吸引するためのサンプラー102が装備されており、cDNAや蛋白質のサンプル溶液103を順次供給することができる。この場合、送管の径が十分に小さいため、各サンプル溶液はそれぞれの層を形成し、サンプル同士が混合することは無い。マイクロアレイの形成は、静電噴霧されるサンプル溶液が変わる毎にXY（或いはXYZ）ステージにより新たな位置にサンプルチップ104またはマスク105を移動し、所望の堆積エリアにスポットを形成させることにより行う。この場合も、スクリーニング実験等を目的とする等の場合には、

多少のコンタミネーションは問題とならないため、キャピラリ交換・洗浄をせずに順次サンプル溶液を吸引して、エレクトロスプレイを行うか、または、サンプル溶液の間に純水を洗浄液として取り込み、サンプル溶液をスプレー後、この純水をスプレーしてキャピラリ内と送管内とを洗浄することも可能である。この場合、洗浄に用いられた純水は、キャピラリ内から加圧空気で放出された後、蒸発してしまうため洗浄液を回収する機構などは一般的に必要ではない。

- 10 【0027】図8は、XY或いはXYZステージによるマイクロアレイ形成時の駆動方法を示す図である。即ち、図8では、マイクロアレイ形成時のマスク構造体とサンプルチップの相対的な移動の様子を示している。前述したようにマスク構造体下部にはスペーサが装着されているが、これはマスクとサンプルチップ間の距離を適当にとり、マスクと既に形成されたcDNAや蛋白質のスポットに接触し損傷或いはコンタミネーション起こさないよう働くものである。このため、エレクトロスプレイ時にはスペーサーとサンプルチップ表面が接触している。20 スペーサの厚さは、スポットの高さに応じて決定される。また、スペーサは、既に堆積された試料スポットと干渉しないような形状及び寸法にデザインされる。マイクロアレイ形成時の移動方法には、XY平面内のみで動く方法（図8A）とXY平面内及びZ方向（マスクが離れる方向）に移動する方法（図8B）の2方法が考えられる。前者は、サンプルチップ表面及びスペーサが比較的耐摩耗性に優れた材料で形成されている場合に有効な方法であり、Z方向の制御を必要としないため、構造を簡素にできる。一方、後者の方法は、スペーサが移動することによってサンプルチップ或いはスペーサの表面が30 損傷される可能性がある場合に適応される。

【0028】XY平面内駆動法（図8A）

（1）開始時に、マスク構造体はサンプルチップの所定の位置に位置決めされている。

（2）エレクトロスプレイによりスポットを形成する。

（3）XYステージを駆動することにより、XY平面内でサンプルチップを移動させ、次のスポット位置へと移動する。

- 40 （4）新たにエレクトロスプレイによりスポットを形成する。
上記（3）、（4）を繰り返すことにより必要な数のスポットを形成する。

【0029】XYZ駆動法（図8B）

（1）開始時に、マスク構造体はサンプルチップの所定の位置に位置決めされている。

（2）エレクトロスプレイによりスポットを形成する。

（3）Zステージに駆動によりマスク構造体とサンプルチップを離す。

- 50 （4）XYステージの駆動により、XY平面内でサン

ルチップを移動させ、次のスポット位置に移動する。

(5) Zステージの駆動によりマスク構造体とサンプルチップを接触させる。

(6) エレクトロスプレイによりスポットを形成する。

(7) 上記(3)、(4)を繰り返すことにより必要な数のスポットを形成する。

上記移動は、サンプルチップがXY或いはXYZステージ上に搭載され、マスクが固定されているという仮定の下で説明を行っているが、サンプルチップ、マスク構造体の相対位置が変化すれば良いため、サンプルチップ或いはマスク構造体のいずれかをX軸、Y軸、Z軸方向に駆動することによっても可能である。

【0030】図9は、XY平面内でのマスクの移動方法とスポット形成の順序を示している。図の左上部に示すように、マスクを上から見ると多数の微細孔を持つマスク構造体とその下方にサンプルチップ110が配置されている。サンプルチップ1個を拡大すると、微細孔111を持つマスク構造体の裏側にスペーサ112が配置されている。断面方向の移動の様子は図8で説明した通りであるが、XY方向の移動に際しても、既に形成されたスポットを損傷或いは汚染(コンタミネーション)しないようにマスク構造体とサンプルチップの相対移動を正しく制御する必要がある。図のようなスペーサ112を持つマスク構造体の場合のスポット形成手順を示す。

【0031】(1) サンプルチップ110の左上部に、マスクの微細孔111が位置決めされる。

(2) エレクトロスプレイによりスポットを形成する。

(3) マスクを移動する。

(4) 2番目のスポットをエレクトロスプレイによって形成する。

(5) 移動(3)とスポット形成(4)を繰り返し行い、サンプルチップ上に多数のスポットを形成する。その際に、スペーサが既に形成されたスポットに接触しないように軌跡を制御する。

図の場合、サンプルチップの左上から右に向かってスポット形成を行い、サンプルチップの右端部まで形成を完了した時点で、1列下側の左側のスポットから形成を開始する。これにより既に形成されたスポットにスペーサ112が接触することなく多数のスポットを平面状に形成することができる。以上のような、スポット形成に順序を示す軌跡とスペーサの関係は本図に示された形状に限らず様々な組み合わせが考えられる。

【0032】

【発明の効果】本発明の利点をまとめると、

(1) 別途に調製されたDNA、蛋白質その他の化合物に適用できる。

(2) 短時間で同時に多くのスポットを形成させ、同時に多数のサンプルチップを作製することができる。

(3) 極めて小さいスポット(1~2μm)も作製す

ることができるので高密度のチップを作製できる。

(4) 基板の移動を機械的に制御しているため、スポット間隔を短くでき、これによって高密度のチップを作製できる。

(5) 必要なサンプル量が少ない

(6) 従って、最終商品としてのチップの価格も現在のレベルから相当低減できる。

上述したように、本発明は様々なDNA・蛋白質に適用できるため、多くの用途がある。

【0033】大別すれば、

(1) 遺伝子解析(発現モニタリング、塩基配列決定等)

(2) 蛋白質の機能解明

(3) 診断薬(遺伝子診断、酵素のタイピング、アレルギーの特定、感染菌の同定・タイピング等)

(4) 疾患治療(患者の遺伝的・生理的状态に合った最適薬剤の選択等)

(5) 医薬品等のスクリーニング(多元的なHigh-Throughput Screeningが可能)

(6) 分析(化合物の毒性、環境分析、食品の微生物コンタミネーション分析等)

等があるが、将来、更に広い分野での応用が期待される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明によるシングルキャピラリシステムの構成を示す斜視図である。

【図2】 本発明によるマルチキャピラリシステムの構成を示す斜視図である。

【図3】 マスクの断面図及び分解斜視図である。

【図4】 マルチキャピラリカセットの構造を示す斜視図である。

【図5】 シングルキャピラリの構造を示す斜視図である。

【図6】 マルチキャピラリシステムの電気接続図である。

【図7】 シングルキャピラリシステムの電気・配管接続図である。

【図8】 XY或いはXYZシステムとマイクロアレイ形成時の駆動方法を示す図である。

【図9】 XY平面内でのマスクの移動方法とスポット形成の順序を示す図である。

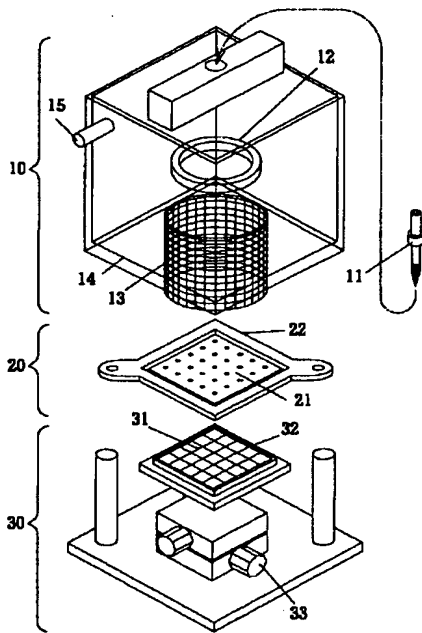
【符号の説明】

10 エレクトロスプレイ部、20 マスク部、30 基板支持部、11 キャピラリ、12 ガードリング、13 シールド、14 ケース、15 乾燥空気入り口、21 マスク、22 マスクホルダ、31 サンプルチップ、32 サンプルチップホルダ、33 XYステージ(或いはXYZステージ(手動または半自動))、51 キャピラリ、52 マルチキャピラリカセット、53 多配線コネクタ、54 ESD電装ユニット(高電

15

圧発生・スイッチング)、55 多配線高圧ケーブル、
56 ケース、57 大型シールド、58 キャピラリ
自動交換ユニット、59 キャピラリカセット格納場所
・サンプル溶液供給装置、60 サンプル溶液パレット、
62 サンプルチップ、63 サンプルチップホル
ダ、64 XY(Z)位置決めステージ、40 マスク
構造体、41 絶縁体層、42 電気導電体層、43
絶縁体層、44 マスク層(絶縁体マスク層)、44a
孔、45 スペーサ、70 マルチキャピラリカセッ
ト、71 キャピラリ保持ベース、72 キャピラリ、
73 多配線コネクタ、74 各キャピラリへの電気配
線、75 加圧空気入り口、76 加圧空気流路、77
サンプル溶液、80 シングルキャピラリ、81 キ

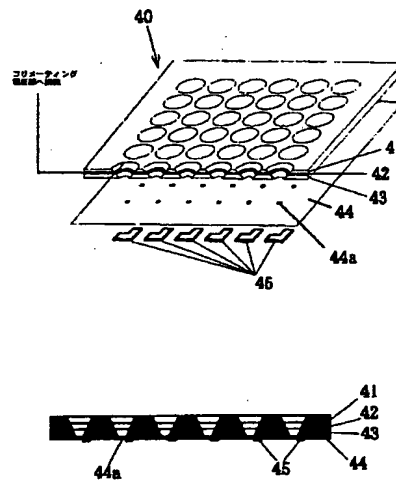
【図1】



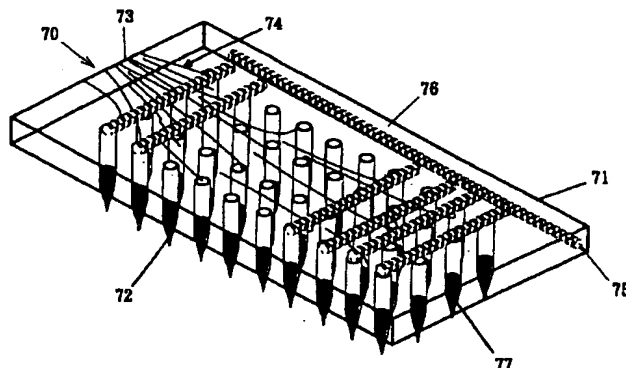
16

ャピラリ、82 導電性ワイヤ、83 キャピラリ保持
具、84 加圧空気・サンプル溶液入り口、90 キャ
ピラリ、91 高電圧スイッチ、92 ガードリング、
93 マスク構造体、94 サンプルチップ、95 ガー
ドリング電極、96 導電性ワイヤ、97 サンプル溶
液、V1 エレクトロスプレー高電圧、V2 ガードリ
ング電圧、V3 コリメーティング電圧、101 送液
ポンプ、102 サンプラー、103 サンプル溶液、
104 サンプルチップ、105 マスク構造体、10
6 ガードリング、107 高電圧スイッチ、108
導電性ワイヤ、110 サンプルチップ、111 マス
ク孔、112 スペーサ、113 コリメーティング電
極

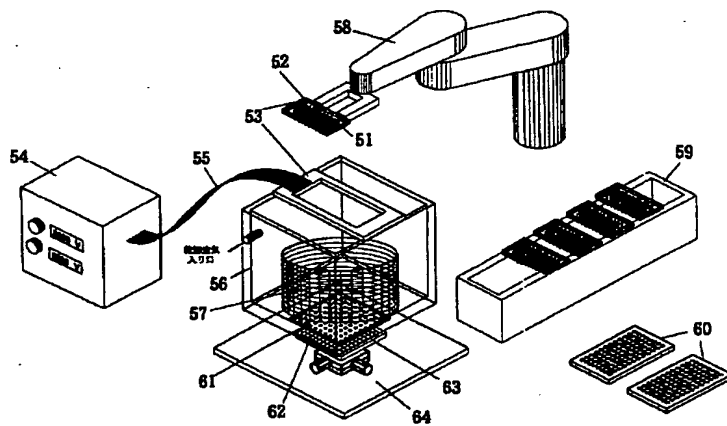
【図3】



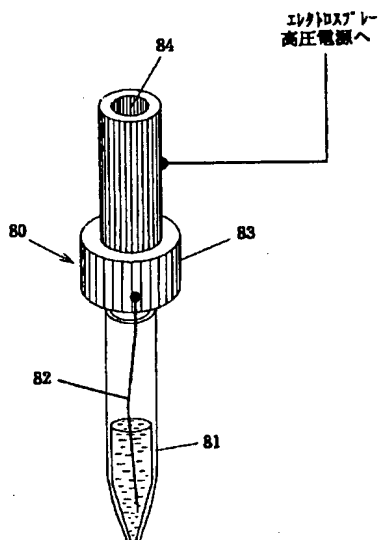
【図4】



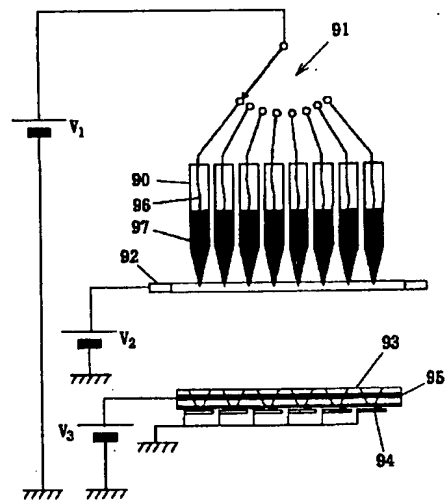
【図2】



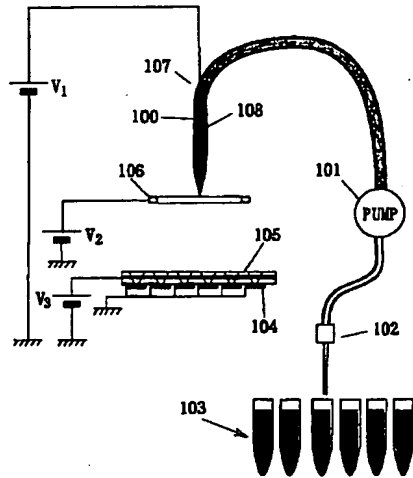
【図5】



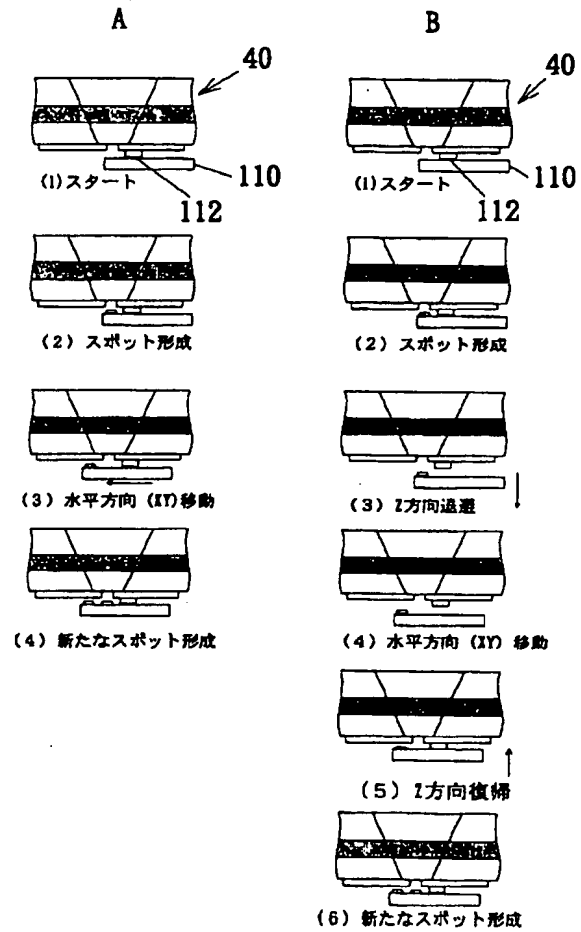
【図6】



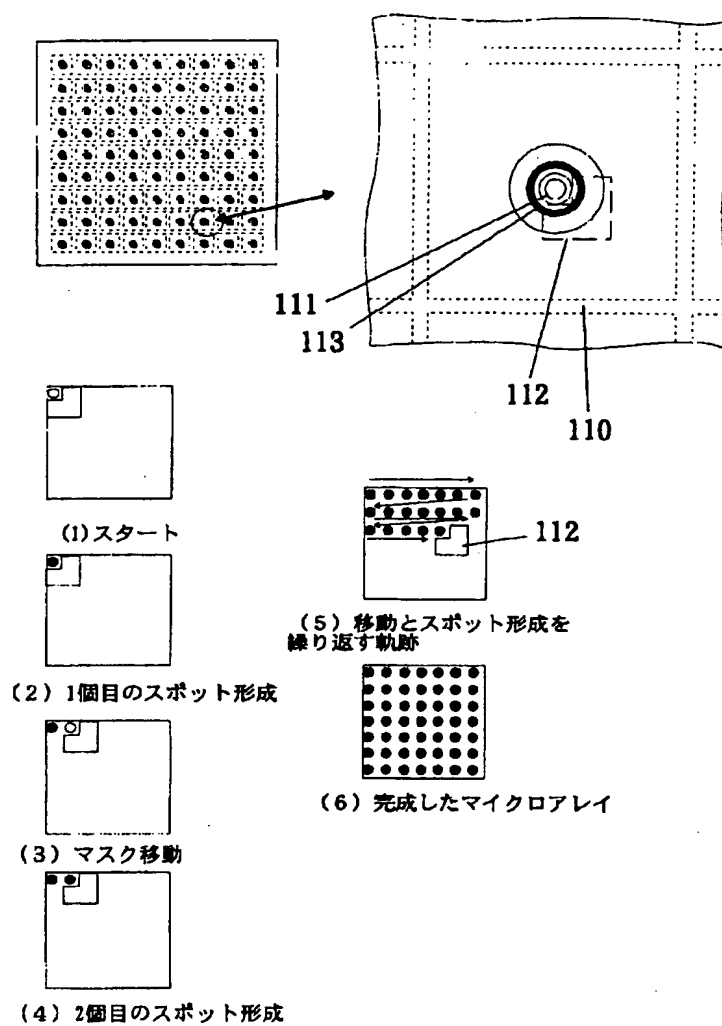
【図7】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(72)発明者 井上 浩三
東京都渋谷区広尾1-11-5-1403 エ
ス・ティ・リサーチ株式会社内

Fターム(参考) 2G058 AA09 CC09 EA11